



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 101 08 453 A 1

⑮ Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68
G 01 N 27/62

⑰ Anmelder:
Bruker Saxonia Analytik GmbH, 04318 Leipzig, DE

⑰ Erfinder:
Kostrzewa, Markus, 04451 Borsdorf, DE; Fröhlich, Thomas, 04179 Leipzig, DE; Wenzel, Thomas, 04328 Leipzig, DE; Jäschke, Andreas, 14109 Berlin, DE; Hausch, Felix, Stanford, Calif., US

⑯ Entgegenhaltungen:
US 60 43 031 A
EP 08 40 804 B1
A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. SAUER,S. u.a., Nucleic Acids Res. (2000) 28 (5) e13i-viii;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Massenspektrometrische Mutationsanalyse mit photolytisch spaltbaren Primern

⑰ Die Erfindung betrifft ein Verfahren einer massenspektrometrischen Untersuchung von bekannten Mutationstellen im Genom, beispielsweise SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), mit Hilfe des Verfahrens der beschränkten Primerverlängerung.
Die Erfindung betrifft die Verwendung von Primern, die einen photospaltbaren Linker besitzen. Der Linker stellt nahezu den gleichen Abstand in einem DNA-Strang her wie ein natürlicher DNA-Baustein (Nukleotid). Der Linker überbrückt ein Basenpaar und verhindert weder die Hybridisierbarkeit noch die enzymatische Verlängerung. Andererseits erlaubt er es, die Primer nach Verlängerung zu spalten, um so besser massenspektrometrisch nachweisbare, kurze DNA-Fragmente zu erhalten.

DE 101 08 453 A 1

DE 101 08 453 A 1

DE 101 08 453 A 1

1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren einer massenspektrometrischen Untersuchung von bekannten Mutationsstellen im Genom, beispielsweise SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), mit Hilfe des Verfahrens der beschränkten Primerverlängerung.

[0002] Die Erfindung betrifft die Verwendung von Primern, die einen photosalzbaren Linker besitzen. Der Linker stellt nahezu den gleichen Abstand in einem DNA-Strang her wie ein natürlicher DNA-Baustein (Nukleosid). Der Linker überbrückt ein Basenpaar und verhindert weder die Hybridisierbarkeit noch die enzymatische Verlängerung. Außerdem erlaubt er es, die Primer nach Verlängerung zu spalten, um so besser massenspektrometrisch nachweisbare, kurze DNA-Fragmente zu erhalten.

Stand der Technik

[0003] Gegenstand dieser Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von konkreten mutativen Veränderungen der genomischen DNA, wobei die Mutationsstelle an sich bekannt sein muss. Bei diesen mutativen Sequenzveränderungen kann es sich um einen Basenaustausch ("Punktmutation") handeln, um eine Einfügung von Nucleotiden ("Insertion") oder um das Fehlen von Nucleotiden ("Deletion"). Besonders bekannt geworden sind die Punktmutationen unter der Abkürzung "SNP" (Single Nucleotide Polymorphisms). Für den Menschen werden mindestens 3 Millionen häufiger vorkommende SNPs vermutet, die den größten Teil der individuellen Unterschiede zwischen den Menschen charakterisieren und die genetischen Individualanlagen steuern.

[0004] Gewöhnlich wird für ein Genom ein "Wildtyp" definiert, der als mutationsfrei angesehen wird. Gemessen an der Häufigkeit von Mutationen, beispielsweise SNPs, und an der Gleichberechtigung von mutiertem Typ (Mutant) und Wildtyp ist die Definition des Wildtyps willkürlich oder zumindest rein zufällig.

[0005] Nahezu alle Mutationen der DNA, darunter alle oben definierten Mutationen, erzeugen einen Unterschied der Masse eines DNA-Ausschnitts, das diese Mutation enthält, gegenüber der Masse des entsprechenden Ausschnitts des Wildtyps. Daher kann eine genaue Bestimmung der Masse eines DNA-Ausschnitts für eine Bestimmung einer Mutation herangezogen werden.

[0006] Massenspektrometrie ist eine sehr leistungsfähige Methode für die Massenbestimmung von Biomolekülen. Die Ionen können massenspektrometrisch, beispielsweise in Flugzeitmassenspektrometern mit Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI), auf ihre Masse analysiert werden. Aber auch eine Ionisierung durch Elektrosprühen (ESI) kann angewendet werden, in der Regel dann mit Massenspektrometern anderer Art.

[0007] Mit Polymerase-Kettenreaktionen (PCR = polymerase chain reaction) können unter Verwendung eines Paares von "Selektionsprimern", das sind Einzelstrang-Oligonucleotide mit einer Länge von etwa 20 Basen, in bekannter Weise ausgewählte doppelsträngige DNA-Produkte mit einer Mindestlänge von etwa 40 Basenpaaren hergestellt werden. Durch die Wahl der Sequenzen dieser beiden Selektionsprimer kann man die Mutationsstelle einschließen.

[0008] Das naheliegende Verfahren, für die Mutationsbestimmung einfach die Masse von PCR-vervielfältigten DNA-Produkten massenspektrometrisch zu messen, hat sich als fast undurchführbar herausgestellt, da sich eine präzise Massenbestimmung an DNA-Produkten mit mehr als 40 Basenpaaren Länge als praktisch unmöglich erwiesen hat. Die Gründe dafür sind unten angegeben. Somit hat man nach

2

Verfahren gesucht, die zu kürzeren DNA-Fragmenten führen. Es ist dafür das Verfahren der beschränkten, mutationsabhängigen Primerverlängerung entwickelt worden, das zu verlängerten Primern mit etwa 15 bis 25 Nucleotiden Länge führt, aus deren Masse die Art der Mutation besser bestimmt werden kann.

[0009] Für dieses Verfahren werden zunächst durch Polymerase-Kettenreaktionen (PCR = polymerase chain reaction) mit Hilfe eines Paares von Primärprimern genügend 10 viele Kopien eines DNA-Segmentes erzeugt, die die Mutationsstelle enthalten. Diese DNA-Segmente dienen als Template (Kopivorlagen) für die enzymatische, mutationsabhängige Verlängerung eines Sekundärprimers. Dieser Sekundär- oder Verlängerungs-Primer wird im Folgenden der 15 Einfachheit halber als "Primer" bezeichnet. Er kann mit einem der beiden Selektionsprimer identisch sein; es ist jedoch besser, hier einen eigenen, nicht identischen Primer zu verwenden.

[0010] Dieser Primer ist eine kurze DNA-Kette von etwa 20 15 bis 20 Nucleotiden Länge, die als Erkennungssequenz für die Stelle einer möglichen Mutation fungiert. Der Primer wird synthetisiert, und zwar mit solch einer Basensequenz, dass er sich in der Nähe einer bekannten Punktmutationsstelle an den Templatstrang genau basenkomplementär anlagern kann (man spricht bei dieser Art der Anlagerung von "Hybridisierung").

[0011] Im einfachsten Fall wird der Primer so konstruiert, dass er sich direkt benachbart vor der möglichen Mutationsstelle anlagent. Seine enzymatisch gesteuerte Verlängerung 30 durch eine Polymerase wird unter Verwendung von Didesoxy-Versionen (ddNTP) der vier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP, im einzelnen dATP, dGTP, dCTP, dTTP) durchgeführt. Diese Didesoxy-nukleosidtriphosphate (ddNTP, im einzelnen ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) dienen als Terminatoren; ihr Einbau stoppt jede weitere Verlängerung. Welches der vier ddNTPs eingebaut wird, hängt von der Kopivorlage des Templat ab: hier spiegelt sich die Mutationsstelle komplementär wider. Die vier möglichen 35 Terminatoren unterscheiden sich (wie die zugehörigen Desoxynukleosidtriphosphate) um mindestens 9 bis maximal 40 atomare Masseneinheiten. Aus der Bestimmung der Masse des so verlängerten Primers kann also – im Prinzip – auf die tatsächlich vorliegende Mutation geschlossen werden. Dieses Verfahren, das immer zu Produkten mit einer 45 gleichen Anzahl von Nucleotiden führt, soll im Folgenden "Nucleotidzahl-gleiche Primerverlängerung" genannt werden.

[0012] Leider ist die genaue Bestimmung der Masse von Oligonucleotiden schwierig. Aufgrund des Polyanionencharakters der DNA lagern sich besonders leicht ubiquitär vorkommende Natrium- oder Kaliumionen unterschiedlicher Anzahl an die Oligonucleotide an (Adduktbildung). Diese unbestimmt starke Adduktbildung macht jede genauere Bestimmung der Masse außerordentlich schwierig; zumindest erzwingt sie eine extrem gute Reinigung und eine sorgsam überwachte Konstanz aller Verfahrensparameter. Die Anwendung der Nucleotidzahl-gleichen Primerverlängerung ist daher sehr schwierig, weil sie fehleranfällig ist.

[0013] Es ist deswegen eine andere Art der mutationsabhängigen Primerverlängerung entwickelt worden, bei denen der Massenunterschied des DNA-Produkts zwischen den beiden homozygoten Formen, also zwischen Wildtyp und Mutante, jeweils mindestens ein Nucleotid, also mindestens etwa 300 atomare Masseneinheiten beträgt. Dieses Verfahren soll im Folgenden als "Nucleotidzahl-verschiedene Primerverlängerung" bezeichnet werden.

[0014] Hier muss der Primer nicht unmittelbar neben der möglichen Mutationsstelle hybridisieren. Zwischen der Po-

sition dieser möglichen Mutation und dem 3'-Ende des Primers (an diesem Ende wird der Primer verlängert) darf die Sequenz des Templatstrangs aus maximal drei der vier Nucleotide zusammengesetzt sein. An der Mutationsposition tritt ein weiteres Nucleotid zum ersten Mal auf. Mit Hilfe einer Polymerase und eines besonderen Satzes von unmodifizierten Desoxy-Nucleosidtriphosphaten (dNTP), komplementär zu den Nucleotiden, die bis zur Punktmutation position maximal auftreten, und mindestens eines Didesoxy-nucleosidtriphosphats (ddNTP), komplementär zu mindestens einem der möglichen Nucleotide der polymorphen Position, wird der Primer dann am Templat komplementär kopierend verlängert. Ein Didesoxy-nucleosidtriphosphat beendet ("terminiert") die Kettenverlängerung. Je nach An- oder Abwesenheit der Punktmutation wird die Polymerasereaktion auf der Mutationsposition terminiert oder sie terminiert erst bei dem nächsten, einem Terminator entsprechenden Nucleotid, jenseits der potentiellen Mutationsstelle. Die Verlängerungsprodukte von Wildtyp und Mutante unterscheiden sich bei dieser Nucleotidzahl-verschiedenen Primerverlängerung also in ihrer Länge um mindestens ein Nucleotid, also um mindestens etwa 300 atomaren Masseneinheiten. Es ist damit keine hohe Massengenauigkeit für die Bestimmung des Mutationstyps mehr erforderlich, und der Unterschied zwischen den Massen der Mutation und dem Wildtyp liegt außerhalb des Bereichs von Metallionen-Addukten; damit wird die massenspektrometrische Aufgabe ganz wesentlich erleichtert.

[0015] Dieses Verfahren der Nucleotidzahl-verschiedenen Primerverlängerung ist etwas aufwendiger in der Probenvorbereitung, da für jede der vier Arten von Nucleobasen an der Mutationsstelle eine eigene Mischung von dNTPs und ddNTPs anzuwenden ist. Nachteilig ist auch die geringere Multiplexierbarkeit: es lassen sich in einer einzigen Probe nicht gleichzeitig so viele Mutationen nachweisen, wie dies im erstbeschriebenen Verfahren der Nucleotidzahl-gleichen Primerverlängerung möglich ist. Die Multiplexierbarkeit ist auch dadurch eingeschränkt, dass für die zu kombinierenden Einzelreaktionen ein kompatibles Set an dNTPs und Terminatoren gefunden werden müssen. Das Verfahren hat aber den Vorteil, unempfindlicher gegen Spuren von Verunreinigungen und gegen Nichtkonstanz der Messbedingungen zu sein. Ein weiterer Vorteil ist es, die Anlagerungsstelle des Primers freier auswählen zu können, und daher die Möglichkeit zu haben, durch das Design des Primers immer die gleichen Prozessbedingungen für die Verlängerung einhalten zu können.

[0016] Das MALDI-Präparations- und Messverfahren besteht darin, dass zunächst die Analytmoleküle auf einem Probenträger in eine feste, UV-absorbierende Matrix, meist eine organische Säure, eingebettet werden. Der Probenträger wird in die Ionenquelle eines Massenspektrometers eingeführt. Durch einen kurzen Laserpuls von etwa 3 Nanosekunden Länge wird die Matrix ins Vakuum verdampft; das Analytmolekül wird dabei weitgehend, aber leider nicht völlig unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit gleichzeitig entstehenden Matrixionen wird die Ionisation des Analytmoleküls erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden die Ionen in der Ionenquelle auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere. Die gemessene Flugzeit wird in die Masse der Ionen umgerechnet.

[0017] MALDI eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nucleinsäureketten ist etwas schwieriger. Für kurzketige Nucleinsäuren ist die Ionisierung im MALDI-Prozeß etwa 100-mal geringer

als für Peptide und nimmt mit zunehmender Masse überproportional ab. Der Grund dafür liegt darin, daß für die Ionisation von Peptiden und Proteinen lediglich ein einziges Proton eingefangen werden muß. Für Nucleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Zucker-Phosphatkopf haben (pro Nucleotid eine negative Ladung), ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. Die nachzuweisenden DNA-Segmente (die verlängerten Primer) müssen also möglichst kurz sein, um gut nachgewiesen werden zu können.

[0018] In ähnlicher Weise kann auch eine Ionisierungsme thode verwendet werden, die von einer Lösung der Proben ausgeht. Sie wird Elektrosprühen (ESI = electro spray ionization) genannt. Sie eignet sich ebenfalls ausgezeichnet für Peptide und Proteine, und hat ähnliche Schwierigkeiten mit Oligonucleotiden. Auch hier müssen die nachzuweisenden Oligonucleotide möglichst kurz sein.

[0019] Für MALDI spielt die Wahl der Matrix eine wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden gibt es einige sehr leistungsfähige Matrices, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA sind zwar mittlerweile einige effektive Matrices gefunden worden, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied zu Proteinen nicht verringert.

[0020] Dieser Empfindlichkeitsunterschied kann aber verminder werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, daß sie einem Peptid ähnlicher wird. Wie in WO 96/27681 (Gut und Beck) dargelegt, lassen sich beispielsweise Phosphorothioat-Nucleinsäuren, bei denen die Phosphat-durch Thiophosphat-Gruppierungen substituiert sind, durch einfache Alkylierung in eine ladungsneutrale DNA umwandeln. Diese ladungsneutrale DNA-Modifikation kann wie ein Peptid ionisiert werden. Adduktbildungen und Fragmentierungen finden kaum mehr statt.

[0021] Zusätzlich zur Neutralisation kann auch eine einzelne positiv oder negativ geladene Gruppierung ("charge tag") an diese modifizierte DNA kovalent gebunden werden. Diese Ankopplung einer Ladung erlaubt die Verwendung von nicht-protonierenden Matrices; sie resultiert gleichzeitig in der Steigerung der Empfindlichkeit der modifizierten DNA und in einer Unterdrückung der Ionisierung von Verunreinigungen, die keine Ladung tragen.

[0022] Durch diese Modifikationen hat sich auch die Möglichkeit eröffnet, ähnliche Matrices zu benutzen, wie sie für die Desorption von Peptiden verwendet werden. Für Produkte mit Charge Tags können sogar nichtprotonierende Matrixsubstanzen verwendet werden. Ein weiterer Vorteil des "charge tagging" ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegenüber Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter DNA-Analyte stark erschweren. Aber auch für diese modifizierten Oligonucleotide hat es sich als günstig erwiesen, die nachzuweisenden Segmente möglichst kurz zu halten.

[0023] Für die Verkürzung der Oligonucleotide ist ein Verfahren entwickelt worden, in dem ein Teil des verlängerten Primers enzymatisch verdaut wird. Dies kann erreicht werden, indem nur eine kurze Kette von Nucleotiden am 3'-Ende des zu verlängern Primers mit Thioatgruppierungen versehen wird, während die Mehrzahl der Nucleotide nicht modifiziert wird. Die regulären Nucleotide können dann mit Exonucleasen (Phosphodiesterasen) verdaut werden, während die Phosphorothioate gegenüber einem Verdau resistent sind. Der Exonucleaseverdau nimmt eine beträchtliche Zeit in Anspruch und verläuft nicht immer quantitativ.

[0024] Es wird daher immer noch nach Probenvorbereitungsverfahren für massenspektrometrische Mutationsanalysen gesucht, die einfacher und sicherer handzuhaben sind.

Aufgabe der Erfindung

[0025] Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein vereinfachtes und sicheres Verfahren für die schnelle Aufbereitung von DNA-Proben für die massenspektrometrische Untersuchung von Genmaterial auf vorbekannte Mutationen mit dem Potential zu hoher Multiplexierbarkeit zu finden.

[0026] Für diese Aufgabe ist es günstig, die Kettenprodukte so kurz wie möglich zu machen, indem der überwiegende Teil des Primers, der keine Information über die Mutation liefert, aus den Kettenprodukten entfernt wird. Dadurch wird das Molekulargewicht der DNA-Kettenprodukte klein und die Präzision der Massenbestimmung steigt. Es ist weiterhin günstig, die DNA-Kettenprodukte, die im Molekulargewicht die Information über die untersuchte Mutation tragen, weitgehend zu neutralisieren und darüberhinaus gezielt mit einer ladungstragenden Gruppierung zu versehen, um sie im MALDI- oder auch im ESI-Prozess bevorzugt mit hoher Empfindlichkeit und selektiv vor anderen Bestandteilen der PCR-Reaktionslösung ionisieren zu können.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0027] Die Erfindung besteht darin, beim Verfahren der Primerverlängerung nicht mit den normalerweise verwendeten Primern zu arbeiten, sondern mit wie folgt modifizierten Primern: Die Primer enthalten, etwa einige Nucleotide von dem zu verlängernden 3'-Ende entfernt, einen photospaltbaren Linker, der in seiner Größe näherungsweise eine Nucleobase überbrückt und dabei weder die Hybridisierung an das PCR-vervielfältigte Templat noch die enzymatische Verlängerung des Primers wesentlich verhindert. Dieser Linker wird nach der mutationsabhängigen Verlängerung des Primers durch UV-Licht gespalten. Dabei entstehen als massenspektrometrisch zu vermessende Produkte sehr kurze Spaltstücke des verlängerten Primers, wobei die kurzen Spaltstücke die Information über die Mutation enthalten. Die Länge der Primerspaltstücke kann zwischen etwa vier bis zehn Basen frei gewählt werden; damit werden die zu messenden DNA-Produkte etwa 1200 bis 3000 atomare Masseneinheiten schwer. Das ist der günstigste Massenbereich sowohl für MALDI- wie auch für ESI-Massenspektrometer. Diese Primerspaltstücke lassen sich massenspektrometrisch sehr gut untersuchen, besonders wenn die unten angegeben weiteren Modifikationen eingesetzt werden, wobei sowohl MALDI wie auch ESI eingesetzt werden kann.

[0028] Als photospaltbare Linker können dabei insbesondere Bausteine aus der Verbindungsklasse der α -Nitrobenzyl-Derivate eingesetzt werden. Nach Überführung der α -Nitrobenzyl-Derivate in aktivierte Phosphoramidite, können sie in jeder beliebigen Position eines Primers eingebaut werden. α -Nitrobenzyl-Derivate stören die Hybridisierung nicht und senken nur minimal die optimale Hybridisierungstemperatur während einer DNA-Polymerasereaktion. Sie werden von verschiedenen Polymerasen als nichtstörend akzeptiert. Die Synthese sowie der Mechanismus von photospaltbaren 1-(2-Nitrophenyl)ethylestern diverser Phosphate und Thiophosphate wurden bereits von Ordoukhanian und Taylor eingehender untersucht (J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 9570-9571).

[0029] Werden zwischen dem Linker und dem 3'-Ende des Primers Phosphorothioat-Nucleotide eingesetzt, so können diese vor oder nach der Photospaltung alkyliert werden und ergeben so als Produkte kurze modifizierte Oligomere mit "peptidähnlichen Eigenschaften" bzgl. MALDI-MS. Die mutationsabhängige Primerverlängerung kann für dieses Verfahren sehr einfach mit vier ddNTPs erfolgen (Nucleotidzahl-gleiche Primerverlängerung), da sich die Masse die-

ser "peptidähnlichen Produkte" sehr gut bestimmen lässt, und die neutralisierten Moleküle keine Metallionenaddukte bilden. Damit sind die Unterschiede von 9 bis 40 atomaren Masseneinheiten leicht bestimmbar.

- 5 [0030] Werden α -Thio-didesoxynucleosid-Triphosphate (α -S-ddNTPs) als Terminatoren verwendet, die nach der Verlängerung wie die Phosphorothioat-Nucleotide alkyliert werden, so ist es möglich, die Produkte im negativen Betriebsmodus eines Massenspektrometers zu messen, da der Photolinker beim Zerfall eine doppelt negativ geladene Phosphatgruppe am 5'-Ende des zu messenden Oligomers generiert. Da in der Gasphase eine negative Ladung der Phosphatgruppe durch die saure Matrix (z. B. 3-HPA) neutralisiert wird, entsteht letztendlich ein einfach negativ geladenes Oligomer, das sozusagen als mit einem negativen Charge Tag versehen angesehen werden kann. Es ist auch möglich, sich der Methode des positiven Charge Tags zu bedienen. Die Ladung kann beispielsweise durch Binden einer positiv geladenen Gruppe an den terminierenden α -S-ddNTPs angebracht, aber auch an einem der Phosphorothioat-Nucleosid-Bausteine des Primers gebunden sein. Zur Einführung der positiven Ladung dienen beispielsweise quartäre Ammoniumsalze.
- 10 [0031] Durch die höhere Stabilität und die Adduktfreiheit der bis auf die Charge Tags neutralisierten DNA-Produkte ergeben sich viel schärfere Massensignale mit verbessertem Signal-zu-Rausch-Verhältnis; die Empfindlichkeit ist gesteigert und die Massenbestimmung wird erleichtert.
- 15 [0032] Diese ladungsneutralisierten Abwandlungen des Verfahrens der Nucleotidzahl gleichen Primerverlängerung sind daher besonders auch für die Multiplexierung geeignet; dabei werden in einer Probe gleichzeitig mehrere mögliche Mutationen untersucht, die durch die Wahl der Länge der erzeugten DNA-Produkte, aber häufig sogar bei gleicher Anzahl von Nucleotiden, leicht unterscheidbar sind. Dieses Verfahren der Multiplexierung ist dem Fachmann an sich bekannt; hier ist es jedoch besonders günstig einzusetzen, da der an sich dramatische Empfindlichkeitsabfall normaler DNA-Produkte mit ihrer Länge durch die Neutralisierung reduziert ist, und damit der parallele Nachweis der verschiedenen Produkte erleichtert wird. Durch die Verschiebung der Produktmassen in einen Bereich erhöhter Auflösung ist außerdem eine engere Staffelung dieser Produktmassen in Multiplex-Reaktionen möglich.
- 20 [0033] Natürlich kann auch das Verfahren der Nucleotidverschiedenen Primerverlängerung in der beschriebenen Weise mit Hilfe von photospaltbaren Linkern verbessert werden. Weiterhin ist es möglich, durch die beschriebene photolytische Verkürzung der Reaktionsprodukte die Nucleotidzahl gleiche Primerverlängerung ohne weitere chemische Modifikationen mit erhöhter Zuverlässigkeit und Multiplexierbarkeit durchzuführen, da die sehr kurzen DNA-Moleküle durch wesentlich verringerte Anzahl von negativen Ladungen deutlich weniger zur Adduktbildung neigen.
- 25 [0034] Primer lassen sich – wie dem Fachmann bekannt – auch mit Biotin am 5'-Ende herstellen. Mit biotinylierten Verlängerungsprimern der erfahrungsgemäß linker-enthaltenden Art können die Reinigungsprozesse vereinfacht werden. Die Probenlösungen mit den verlängerten Primern werden beispielsweise auf besondere Ankerflächen des massenspektrometrischen Probenträgers aufpipettiert. Diese Ankerflächen sind mit kovalent an die Trägeroberfläche gebundenem Streptavidin belegt. Die biotinylierten Enden der Produkte binden in bekannter Weise an das Streptavidin. Der Probenträger mit den aufgebrachten Proben kann jetzt in einfacher Weise gewaschen werden, wobei die Polymerase, die überschüssigen ddNTPs, die Puffer aus den ver-

wendeten Lösungen, die Template und Verunreinigungen gemeinsam aus allen Proben entfernt werden können. Nach dem Trocknen der Probenträgerplatte können die Produkte photolytisch gespalten werden. Alternativ kann die Anbindung der biotinylierten Oligos auch an andere Streptavidin-beschichtete Oberflächen erfolgen, etwa in Mikrotiterplatten. Die Spaltprodukte werden dann mit einer Matrixlösung aufgenommen, mit der Matrixsubstanz durch Trocknen auskristallisiert und massenspektrometrisch gemessen.

[0035] Ausser der Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung sind auch andere Mechanismen zur Anbindung des linkertragenden Primers an eine Oberfläche denkbar, zum Beispiel durch die Reaktion einer 5'-Aminogruppe am Oligomer.

Besonders günstige Ausführungsformen

[0036] Eine günstige Ausführungsform basiert auf einem biotinylierten Primer mit erfundungsgemäß photospaltbarem Linker, der genau um eine Base verlängert wird. Das Verfahren besteht aus folgenden Schritten:

Es werden zunächst die Selektions- oder Primärprimerpaare für die PCR-Vervielfältigung eines DNA-Produkts ausgesucht, hergestellt oder gekauft. Diese Primärprimer schließen die mögliche Mutationsstelle (oder sogar mehrere) relativ weiträumig ein. Sie werden, eventuell mit Hilfe entsprechender Softwareprogramme, so ausgesucht, dass die PCR-Vervielfältigung mit Standardverfahren ablaufen kann, das heißt mit gleichen Verfahrensparametern für alle Proben. Die Primer können unter Angabe der Sequenz bei spezialisierten Firmen bestellt werden. Mit diesen Selektionsprimernpaaren werden genügend Template hergestellt, die als Kopiervorlagen für die Primerverlängerung dienen.

[0037] Sodann werden die Verlängerungs- oder Sekundärprimer bestimmt. Sie müssen direkt neben der möglichen Mutationsstelle anlagern können. Sie enthalten ein biotinyliertes 5'-Ende, eine Kette von etwa 10 bis 17 normale Nucleotide, einen erfundungsgemäß photospaltbarem Linker, und etwa 3 bis 7 weitere Nucleotide bis zum 3'-Ende. Diese Primer können unter spezialisierten Angaben (möglichst unter Zulieferung der Linkertriphosphate) ebenfalls von spezialisierten Firmen hergestellt werden.

[0038] Nach der PCR-Vervielfältigung einer DNA-Sequenz mit den selektierenden Primerpaaren wird die PCR-Lösung von den dNTP-Bausteinen gereinigt, beispielsweise durch enzymatischen Verdau der dNTPs mit anschließender thermischer Deaktivierung der Verdauenzyme. Nach Zugabe der Verlängerungsprimer und der terminierenden ddNTPs und einer geeigneten DNA Polymerase wird durch die üblichen Temperaturzyklen mit der Verlängerung der Primer begonnen. Der Temperaturzyklus für die Verlängerung wird mehrere Male wiederholt, da die Verlängerung nicht immer im ersten Schritt gelingt.

[0039] Sind die Verlängerungsprimer weitgehend durch den Verlängerungsprozess aufgebraucht, so wird die unge reinigte PCR-Lösung mit den verlängerten Primern mit einem Bindungspuffer gemischt und auf die mit Streptavidin belegten Anker der Probenträgerplatte aufpipettiert, wobei die biotinylierten Enden der verlängerten Primer an das Streptavidin binden. Durch entsprechendes Waschen können nun alle Bestandteile der PCR-Lösung, die Puffer, die unverbrauchten ddNTPs, die Template, die restlichen Primärprimer, die Enzyme und Salze durch gemeinsames Waschen aller Proben entfernt werden. Es können viele verschiedene Proben auf eine Trägerplatte aufgebracht und gleichzeitig gewaschen werden. Die Probenträgerplatte wird anschließend getrocknet. Die getrocknete Probenträgerplatte wird nun mit UV-Licht bestrahlt, um die Linker zu spalten. Die Spaltungsprozedur dauert je nach Stärke des

UV-Lichts etwa 5 bis 30 Minuten. Anschließend wird eine Lösung von 3-Hydroxypicolinsäure als Matrixsubstanz aufgegeben, und die Platte wird wieder getrocknet. Dabei kristallisiert die Matrix aus, die von den Primern abgetrennten

5 DNA-Endprodukte werden in die Kristallchen eingebaut. Die Proben auf dem Probenträger werden der massenspektrometrischen MALDI-Analyse zugeführt. Durch die Laserlichtpulse wird ein Teil der Matrix zusammen mit Analytmolekülen verdampft, durch Übertragen von Protonen von 10 der 3-HPA-Matrix auf die DNA-Moleküle entstehen vorzugsweise einfach positiv und einfach negativ geladene Moleküle. Deren Masse kann im MALDI-TOF Massenspektrometer in der entsprechenden Betriebsart bestimmt werden. Die Messung endet in einer Bestimmung der Masse und darüberhinaus in der Zuordnung der Probe zu Wildtyp oder bekannter Mutante.

[0040] In ähnlicher Weise kann die Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Untersuchung mit Elektrosprüh-Ionisierung ablaufen. Hierbei werden die Proben 20 nicht getrocknet, alle Verfahrensschritte laufen in Lösung ab. Eine Bindung an oberflächengebundenes Streptavidin kann beispielsweise in an sich bekannter Weise unter Benutzung von magnetischen Kugelchen (magnetic beads) oder Mikrotiterplattenkavitäten erfolgen, an deren Oberfläche 25 das Streptavidin gebunden ist. Zum Waschen der Produkte lassen sich die magnetischen Kugelchen magnetisch an der Wand der Reinigungsgefäß, beispielsweise Mikrotiterplatten, festhalten.

[0041] Eine andere Verfahrensversion verwendet Primer, 30 die am 3'-Ende mehrere Phosphorothioate enthalten, terminierende α -Thio-didesoxynucleosidtriphosphate und eine sich der Primerverlängerung anschliessende Alkylierung der Phosphorothioate zur Neutralisierung der zu messenden DNA-Fragmente. Es ist dann besonders günstig, solche Nucleosidtriphosphat-Derivate zu verwenden, die bereits mit einer positiv geladenen Gruppe, beispielsweise einer quartären Ammoniumgruppierung, als Charge Tag versehen sind. Die ladungstragende Gruppe kann aber auch an den Phosphorothioat-Nucleotiden des Verlängerungsprimers angebracht sein, besonders günstig an der zweiten, dritten oder vierten Base vom 3'-Ende aus gezählt. In einer solchen Verfahrensweise erübrigt sich die Fixierung, Reinigung und Photospaltung an fester Phase, da die neutralisierten und mit einem Charge Tag versehenen, durch Photospaltung verkürzten DNA-Fragmente durch die um den Faktor 100 gesteigerte Sensitivität ohne weitere Reinigung aus dem Reaktionsansatz gemessen werden können.

[0042] Das Verfahren besteht aus folgenden Schritten: 50 Es werden zunächst wieder die Selektions- oder Primärprimerpaare für die PCR-Vervielfältigung eines DNA-Produkts so ausgewählt, daß das entsprechende PCR-Amplifikationsprodukt die Stelle der Mutation enthält. Dann werden die Verlängerungs- oder Sekundärprimer bestimmt. Sie müssen direkt neben der möglichen Mutationsstelle anlagern können. Sie enthalten am 5'-Ende eine Kette von etwa

55 10 bis 17 normale Nukleotide, danach einen erfundungsgemäß photospaltbaren Linker, und etwa 3 bis 7 weitere Nukleotide bis zum 3'-Ende. Die Bausteine 5' und alle Bindungen 3' vom photospaltbaren Linker sind Phosphorothioate.

[0043] Nach der PCR-Amplifikation der DNA-Zielsequenz werden die restlichen dNTPs durch enzymatischen Verdau entfernt, anschließend das Verdauenzym thermisch deaktiviert. Es werden Verlängerungsprimer, terminierende ddNTPs, eine geeignete DNA-Polymerase (z. B. Thermosequenase) und ein an das Enzym angepasster Puffer zugegeben. In einem mehrfach wiederholten Temperaturzyklus wird die spezifische Verlängerung des Primers durchgeführt. Zur Verlängerung werden vorzugsweise α -Thio-didesox-

ynucleosidtriphosphate (α -S-ddNTPs) verwandt. Anschließend werden die Phosphorothioatbindungen durch Alkylierung neutralisiert. Nach Aufbringen der Lösung auf eine mit Matrix vorbeschickte Trägerplatte wird diese mit UV-Licht bestrahlt, wobei der photospaltbare Linker zerfällt. Durch den Zerfall kann eine Phosphatgruppe am 5'-Ende des alkylierten Phosphorothioat-Fragments verbleiben, welches den Molekülen eine doppelt negative Ladung verleiht. So kann die Masse im MALDI-TOF Massenspektrometer im Negativmodus bestimmt werden, da in der Gasphase eine negative Ladung der Phosphatgruppe durch die saure Matrix (z. B. 3-HPA) neutralisiert wird. Alternativ kann innerhalb des Phosphorothioatanteils des Verlängerungsprimers eine positive Ladung ("Charge Tag") angebracht werden und die Produkte im positiven Modus gemessen werden.

[0044] Die Erfindung ist aber nicht auf die Nucleotidzahl gleiche Primerverlängerung beschränkt, sondern kann auch auf die Nucleotidzahl-verschiedene Primerverlängerung angewandt werden. Auch hier führt der photospaltbare Linker zu einer Vereinfachung des Verfahrens. Möglich ist auch hier wieder die Variante mit einem Primer, der teilweise Phosphorothioatbindungen enthält und nach der Verlängerung, durch Alkylierung neutralisiert wird.

[0045] Ein günstiges Verfahren kann hier so aussehen: Für die erste PCR-Vervielfachung sind die Selektionsprimer naturgemäß so zu wählen, daß sich die zu untersuchenden, bekannten Punktmutationen, Insertionen und Deletionen innerhalb des erzeugten PCR-Produktes befinden.

[0046] Es ist günstig, anschließend die Restnucleotide der PCR-Amplifikation durch an sich bekannte Verfahren zu entfernen, z. B. durch ein "nucleotide removal Kit" der Firma QIAGEN. Alternativ können die Restnucleotide mit einer alkalischen Phosphatase zerstört und die Lösung ohne weitere Aufreinigung weiterverarbeitet werden.

[0047] Anschließend wird außer den erfundungsgemäß mit Linker versehenen, am Ende Phosphorothioatbindungen enthaltenen Verlängerungsprimern ein reduzierter Satz von modifizierten Desoxy-nucleosidtriphosphaten (z. B. α -S-Nucleotide oder α -Me-Nucleotide) zugegeben, in dem dasjenige Nucleotid fehlt, bei dem die Kettenverlängerung spezifisch für die Mutation anhalten soll. Dieses Ende muß so gewählt werden, daß das Molekulargewicht der Produktkette über die Art der Mutation Auskunft gibt. Ergänzend können ein oder mehrere terminierende Didesoxy-Nucleosidtriphosphate zugegeben werden, die nicht als Desoxy-nucleosidtriphosphat vorhanden sind. Dadurch wird erreicht, daß sich mutationsspezifische Kettenabbruchprodukte bilden.

[0048] Die α -S-Nucleotide lassen sich nach ihrem Einbau in die DNA-Kette durch die Polymerisation leicht neutralisieren, beispielsweise durch Alkylierung, insbesondere Methylierung.

[0049] Es ist zweckmäßig, daß die Verlängerungsprimer bereits positive Charge Tags tragen. Das Charge Tag wird vorzugsweise nahe am 3'-Ende des Primers angebracht und das Zucker-Phosphatrückgrat wird zwischen dem 3'-Ende und dem Charge-Tag so gewählt, daß es ladungsneutralisiert werden kann.

[0050] An je einen Strang der als Template dienenden PCR-Produkte werden nun die neu zugegebenen Verlängerungsprimer angelagert und anschließend enzymatisch kopolymer verlängert.

[0051] Danach werden die DNA-Kettenprodukte durch Photolyse der Linker mit UV-Licht verkürzt. Es folgt die chemische Aufbereitung, die zu neutralisierten und mit Charge-Tag versehenen Produkten führt, die sich besonders leicht durch MALDI ionisieren lassen.

[0052] Der Einsatz von Charge-Tags ist natürlicherweise

nur sinnvoll im Zusammenhang mit der Entfernung von allen Restladungen aus den DNA-Produkten, da nur in diesem Fall ein vollständig definierter Ladungszustand des Analytmoleküls erreicht wird. Durch dieses Charge-Tagging und durch eine Ladungsneutralisierung der Rest-DNA wird erreicht, dass die Empfindlichkeit 100-mal verbessert wird, und dass Matrices verwendet werden können, welche selektiv die ionisierende Desorption dieser Modifikationen unterstützen, so daß die massenspektrometrische Analyse ohne

10 Aufreinigung möglich wird.

[0053] DNA hat ein polyanionisches Rückgrat. Durch das Ersetzen von Phosphat-Brücken im DNA-Rückgrat durch Phosphorothioat-Brücken erhält man eine chemische Funktion, in welcher durch einfache Chemie die negative Ladung 15 entfernt werden kann. Die Neutralisierung der DNA trägt dabei nicht nur zur Erhöhung der Ionisierungsausbeute bei, sondern unterdrückt auch die Bildung von Addukten und trägt zur Stabilisierung der DNA im MALDI-Prozeß bei.

[0054] Das Potential dieser Methode liegt einerseits in einer Steigerung der Empfindlichkeit und Verminderung der Adduktbildung durch die implementierten Modifikationen, anderseits können in der MALDI Massenspektrometric selektiv bestimmte Substanzklassen bevorzugt werden, wodurch unerwünschte Reaktionsnebenprodukte ausgeblendet 20 werden können.

[0055] In der Praxis heißt dies, daß durch die eingeführten Modifikationen und die Wahl der massenspektrometrischen Parameter die relevanten Produkte exklusiv analysiert werden können. Die Templat-DNA kann beispielsweise vollständig ausgeblendet werden und muß daher nicht in einer Aufreinigung entfernt werden. Dies erhöht auch die Möglichkeit der Multiplexierbarkeit. Das gesamte Verfahren kommt mit keiner oder sehr wenig Aufreinigung nach den enzymatischen und chemischen Reaktionsschritten aus.

[0056] Es ist natürlich auch hier möglich, die Reinigung durch den Einbau von Biotin am 5'-Ende der Primer zu verbessern.

[0057] Durch entsprechendes Design der Primer, der Schnittfunktionen, und unterschiedlicher Distanzen zu den 40 Punktmutationspositionen, die jedem Fachmann auf diesem Gebiet geläufig sind, können auch mehrere Punktmutationssysteme simultan ("multiplex") analysiert werden. Diese können sogar an beiden DNA-Strängen des DNA-Doppelstrangs, d. h. in entgegengesetzter Orientierung, analysiert 45 werden, wodurch sich eine interne Kontrolle des Ergebnisses und damit eine hohe Analysensicherheit ergibt.

[0058] Nicht nur die Analyse eines einzelnen PCR-Produkts kann in multipler Weise durchgeführt werden. Eine Multiplex-Analyse kann auch mit einem Satz von mehreren 50 PCR-Produkten gleichzeitig durchgeführt werden, die in einem einzigen Multiplex-PCR-V erfahren vervielfältigt wurden. Verschiedene Teile eines Genoms werden dabei simultan in einer multiplexierten PCR amplifiziert. Anschließend kann an jedem PCR-Produkt mit der notwendigen Anzahl Primer die Analyse durchgeführt werden. Besonders einfach ist dieses Verfahren für Basenzahl-gleiche Primerverlängerungen.

[0059] Für Nucleotidzahl-verschiedene Primerverlängerungen ist es wesentlich, daß alle Einzelanalysen mit der gleichen Kombination von Nucleotiden durchgeführt werden müssen, bei Entwurf und Ausarbeitung der Multiplexanalysen ist daher hierauf Rücksicht zu nehmen. Prinzipiell kann mit einer Kombination von maximal vier Nucleotidsystemen jede erwünschte Information über die Mutationen in 60 einer genomischen DNA abgetastet werden.

DE 101 08 453 A 1

11

Patentansprüche

1. Verfahren zur massenspektrometrischen Analyse bekannter Mutationsstellen in genomischer DNA durch das Verfahren der beschränkten, mutationsabhängigen Primerverlängerung, dadurch gekennzeichnet, dass die zu verlängernden Primer in ihrer Nukleotidkette einen photospaltbaren Linker enthalten, der weder die Hybridisierung noch die enzymatische Verlängerung wesentlich behindert, und dass der Linker vor der massenspektrometrischen Analyse durch Bestrahlung mit Licht gespalten wird. 5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sich der Linker 3 bis 10 Basen vom 3'-Ende des Primers entfernt befindet. 15
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker aus der chemischen Verbindungsklasse der o-Nitrobenzyl-Derivate stammt. 20
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Verlängerung durch Verwendung eines Gemisches mit vier Arten von terminierenden Nucleosidtriphosphat-Derivaten erfolgt, so dass die Verlängerung immer nur um genau eine Base erfolgt. 25
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass Didesoxy-Nucleosidtriphosphate als terminierende Nucleosidtriphosphat-Derivate verwendet werden. 30
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Verlängerung mit einem Gemisch aus nicht-terminierenden und terminierenden Nucleosidtriphosphat-Derivaten so erfolgt, dass mutationsabhängig Längenunterschiede der verlängerten Primer von mindestens einer Base entstehen. 35
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Phosphatgruppe der Nucleotide des Primers zwischen dem Linker und dem 3'-Ende sulfurisiert sind und dass die Phosphorothioat-Nucleotide vor der massenspektrometrischen Analyse alkyliert werden. 40
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Verlängerung mit einem Gemisch aus vier Arten terminierender Nucleosidtriphosphat-Derivate vorgenommen wird, und dass im Massenspektrometer die negativ geladenen Ionen gemessen werden. 45
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass Didesoxy-Nucleosidtriphosphate als terminierende Nucleosidtriphosphat-Derivate verwendet werden. 50
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Verlängerung mit einem Gemisch aus vier Arten von terminierenden Nucleosidtriphosphat-Derivaten vorgenommen wird, bei denen das eingebaute Nucleotid wie die Phosphorothioat-Nucleotide des Primers vor der massenspektrometrischen Analyse alkyliert wird, und dass im Massenspektrometer die negativen Ionen gemessen werden. 55
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass α -Thio-didesoxy-nucleosidtriphosphate als terminierende Nucleosidtriphosphat-Derivate verwendet werden. 60
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die terminierenden, α -Thionucleosidtriphosphat-Derivate jeweils zusätzlich eine chemische Gruppe mit einer positiven Ladung tragen. 65
13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass eines der Phosphorothioatnucleotide des

12

- Verlängerungsprimers eine chemische Gruppe mit einer positiven Ladung trägt. 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass sich die chemische Ladungsgruppe vom 3'-Ende aus gezählt an der zweiten, dritten oder vierten Nucleobase befindet. 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der chemischen Ladungsgruppe um eine quartäre Ammoniumgruppe handelt. 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer für die Primerverlängerung einen Anker zur Befestigung einer Ladungsgruppe tragen, die vor der massenspektrometrischen Analyse befestigt wird. 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Anker eine freie Aminogruppe trägt. 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß für die massenspektrometrische Massenbestimmung eine Ionisierung durch matrixunterstützte Desorption eingesetzt wird (MALDI). 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß eine Matrix eingesetzt wird, die nicht zur Ladungsübertragung auf die zu messenden DNA-Produkte beiträgt. 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß als Matrix α -Cyano-4-hydroxyzimtsäuremethylester verwendet wird. 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass das 5'-Ende des zu verlängernden Primers biotinyliert ist. 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Primer nach ihrer Verlängerung zum Reinigen von allen Bestandteilen der zum Verlängern benötigten Reaktionsflüssigkeit über das Biotin an oberflächenfixierte Streptavidin-Moleküle gebunden wird. 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Streptavidin auf der Oberfläche eines Probenträgers gebunden ist, der auch für die weitere massenspektrometrische Analyse verwendet wird. 24. Probenträger für die massenspektrometrische Analyse nach einem der Verfahren aus Ansprüchen 21 bis 23, der in den Probenbereichen mit oberflächenfixiertem Streptavidin belegt ist.

- Leerseite -